

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-083928

(43)Date of publication of application : 31.03.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 05-227097

(71)Applicant : KARUBE ISAO

(22)Date of filing : 13.09.1993

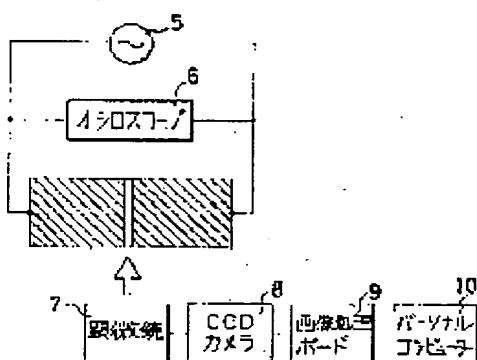
(72)Inventor : IWATA KEISUKE

TAMIYA EIICHI

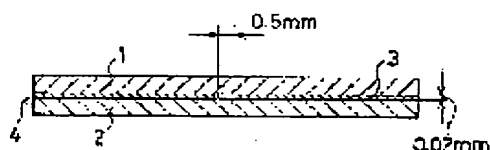
KARUBE ISAO

## (54) DETECTING OR MEASURING METHOD FOR PRESENCE OF BIOLOGICAL AND SPECIFIC REACTIVE MATERIAL

(A)



(B)



(57)Abstract:

PURPOSE: To easily detect a biological and specific reactive material with high speed and high sensitivity by a method wherein an AC voltage is applied to a reaction system under existing of a salt and biological specific agglutination reaction is accelerated whereas electrolysis of a reaction liquid is suppressed. CONSTITUTION: An AC voltage is applied in a device so that electrolysis of a reaction liquid is hard to be generated and to allow a salt to exist, thereby accelerating agglutination reaction. 5-50V/mm of field intensity of the AC voltage is applied. When the field intensity is not higher than 5V/mm, a pearl-chain phenomena (phenomena in which carrier particles are arranged on a straight line) is hard

to occur and the agglutination reaction is not accelerated. When the field intensity is equal to or higher than 50V/mm, the electrolysis is hard to be generated. It is necessary to make the density of the salt put in the reaction system not lower than 10mM. When it is lower than 10mM, the acceleration of the agglutination reaction is rendered insufficient. In the case of measuring the agglutination reaction, electrodes 3, 4 nipped with slide glasses 1, 2 are used and an AC voltage is applied to the reaction system from an AC power source 5 for one minute. After leaving it as it is for one or two minute(s), the image- pickup 8 and image processing 9 are executed so that an agglutination degree is obtained.

## CLAIMS

---

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] Said approach characterized by impressing alternating voltage to this system of reaction so that it may be an approach to detect or measure the existence of the biological specific active substance by the biological specific agglutination reaction on a support particle and a support particle may carry out pearl chain-ization.

[Claim 2] The approach according to claim 1 characterized by being the frequency

whose alternating currents are 10kHz thru/or 10MHz. [Claim 3] The approach

according to claim 1 or 2 characterized by impressing alternating voltage to this system of reaction so that it may become 10 thru/or 50v [ /mm ] criticality

reinforcement under coexistence of the salt of 10 or more mM. [Claim 4] Said

approach which is an approach to detect or measure the existence of the biological specific active substance by the biological specific agglutination reaction on a support

particle, and is characterized by impressing frequency (10kHz thru/or 10MHz) of alternating voltage to this system of reaction under coexistence of the salt of 10 or

more mM. [Claim 5] An approach given in claim 1 thru/or any of 4 they are. [ which is characterized by being under 10 thru/or coexistence of the salt of 300mM(s) ] [Claim

6] The approach according to claim 1 to 5 characterized by the mean particle diameter of a support particle being 0.5 thru/or 10 micrometers. [Claim 7] The

approach according to claim 1 to 6 that concentration of the support particle in the system of reaction is characterized by being 0.01 thru/or 1 % of the weight.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the approach of detecting or measuring existence of the biological specific active substance by the biological specific agglutination reaction on a support particle. Furthermore, it is related with the approach of moreover detecting or measuring existence of the biological specific active substance by high sensitivity more quickly than before and simple in detail by impressing alternating voltage to the bottom of coexistence of a salt at this system of reaction.

[0002]

[Description of the Prior Art] As an approach of detecting or measuring existence of the biological specific active substance, enzyme immunoassay and radiation immunoassay are used conventionally, for example. These approaches are high sensitivity and are high. [ of precision ] However, since there was regulation on that a reagent is unstable, or storage / preservation in order to use an enzyme and a radiation and fine consideration and a fine technique were required in measurement, the simpler

approach was searched for. Moreover, in order that measurement may take long duration comparatively to these approaches, in an emergency test, management is made difficult and high sensitivity and a quick approach came to be studied briskly.

[0003] Various kinds of optical analysis approaches which measure the specific agglutination reaction on support, such as a latex and a corpuscle, are developed in 1970 and afterwards. Generally reaction temperature in these analysis systems is performed in 37-45 degrees C, and a specific agglutination reaction advances by agitating by an impeller etc. Although the time amount which measurement (reaction) takes at this time is 10 - 20 minutes about and is quick compared with enzyme immunoassay and radiation immunoassay, sensitometry and measuring range are said to be inferior compared with said measuring method.

[0004] In order to make easy to detect the aggregate which promotes and forms an immunological agglutination reaction, impressing a direct-current pulse voltage to the system of reaction is known. for example, to Anal.Chem. by JP,59-173761,A (Suzuki et al.), and Matsuoka and others, 57 volumes, and 1998-2002 pages (1985) The distilled water suspension of the *Candida albicans*, and the distilled water solution of an antibody to the cuvette equipped with the electrode After impregnation mixing, It is indicated by by impressing the direct-current pulse voltage of pulse height 100V (field strength of 100v/mm), and promoting an agglutination reaction that the rate of condensation becomes about 50% by the reaction time for about 5 minutes.

[0005] Moreover, the direct-current pulse voltage of pulse height 200V (field strength of 200v/mm) is impressed after mixing in the cuvette which equipped Biosensors by Tamiya and others, 3 (3), and 139-146 pages (1988) with the electrode for the suspension in distilled water of the antibody to human immunoglobulin G combined with the latex particle, and the distilled water solution of human immunoglobulin G, and it is indicated that whenever [ condensation / 50% of ] was obtained after 10 minutes.

[0006]

[The technical problem which should be solved] However, by the approach of impressing the aforementioned direct-current pulse voltage, since promotion of an agglutination reaction is still inadequate, it is not a thing satisfying enough about the measuring time, sensitometry, and the accuracy of measurement. Moreover, by the approach of impressing the aforementioned direct-current pulse, there was a fault that electrolysis of reaction mixture tends to take place, and since it was made not to cause electrolysis, salt concentration of reaction mixture needed to be made low as much as possible. Therefore, it was not able to say it as a simple approach that pretreatment for preparing the salt concentration in the system of reaction in a test portion, especially a biological material is needed etc.

[0007] Therefore, the purpose of this invention improves a trouble which was described above, is still simple and quicker than the conventional measuring method, and is to detect or measure existence of the biological specific active substance by high sensitivity moreover.

[0008]

[Means for Solving the Problem] When this invention persons detected or measured existence of the biological specific active substance by the biological specific agglutination reaction on a support particle, they found out that a salt with the operation which can control electrolysis of reaction mixture remarkably, therefore promotes a biological specific agglutination reaction to this system of reaction rather than the case where a direct-current pulse voltage is impressed could be made to exist by impressing alternating voltage to this system of reaction. This invention is attained based on this knowledge.

[0009] That is, this invention is the approach of detecting or measuring existence of the biological specific active substance by the biological specific agglutination reaction on a support particle, and is characterized by impressing alternating voltage to this system of reaction so that it may become the field strength of 5-50v/mm under coexistence of the salt of 10 or more mM.

[0010] If electric field are stopped standing in a line linearly if a support particle applies electric field (this phenomenon being called pearl chain-ization), and after that, re-distributing the support particle linearly located in a line is known. If the biological specific active substance exists in the case of pearl-chain-izing, even after stopping electric field, re-distribution of support will not take place, but existence of the pearl-chain-ized support will be accepted still more. Therefore, existence of the biological specific active substance can be detected or measured by not re-distributing, even after stopping electric field, namely, measuring the floc which is participating in the biological specific agglutination reaction.

[0011] Promotion of pearl-chain-izing of the support when applying (1) electric field, in order to have attained the purpose of this invention, (2) Promotion of re-distribution of the support which is not participating in a biological specific agglutination reaction after stopping electric field, (3) After stopping electric field, when prevention and control of distribution, and re-(4) electric field of the support which participated in the biological specific agglutination reaction and has been pearl-chain-ized are applied, control \*\* of electrolysis of the reaction mixture in which the salt exists becomes important. Moreover, this invention can detect or measure existence of the biological specific active substance by high sensitivity simpler than the conventional measuring method and quickly by fulfilling all the conditions of above-mentioned (1) - (4).

[0012] The vocabulary which it "biological specific agglutination reaction" Comes to set to this invention shall show a reaction which reacts only with the matter of specification [ a certain matter ], or the matter group of a small number of specification very, and is condensed on a support particle, and may include a broad reaction. For example, the reaction of the reaction (immunoreaction) of an antigen or hapten, and an antibody, the hybridization between complementary nucleic acids, lectin, and its receptor etc. can be mentioned.

[0013] The "biological specific active substance" in this invention carries out the above-mentioned biological specific agglutination reaction, and can choose it from the matter which may be measured with the condensation method which uses a latex, a corpuscle, etc. as support. For example, nucleic acids, such as petrographic constituents,

such as an immunoglobulin of hormone, such as infectious disease markers, such as coagulation fibrinogenolysis yarn markers, such as tumor markers, such as AFP, CEA, CA 19-9, hCG, and ferritin, protein C, Protein S, AT III, and FDP, and D-dimer, CRP and ASO, an HBs antigen, and a HBs antibody, TSH, prolactin, and an insulin, IgG, IgE, IgA and C3, and C4 grade and a complement component, a myoglobin, and a myosin, and DNA, be mentioned.

[0014] As for the electrical potential difference impressed in this invention, it is indispensable that it is alternating voltage. By considering as alternating voltage, electrolysis of reaction mixture cannot take place easily rather than the case of a direct-current pulse voltage, therefore existence of a salt can be permitted in reaction mixture. When a salt exists, a biological specific agglutination reaction is promoted so that it may mention later. Moreover, since existence of a salt is permitted, it can measure, without pretreating a biological material etc.

[0015] In this invention, alternating voltage shall show the electrical potential difference of peak value.

[0016] The waves of the alternating voltage of this invention may be any of a continuous wave and a pulse wave, and although it can consider as the configuration of arbitration, they are a square wave, a square wave, a sine wave, a triangular wave, etc. preferably. It is a square wave most preferably.

[0017] As for the alternating voltage of this invention, it is indispensable to impress so that field strength may be set to mm in 5-50v /. If field strength is smaller than mm in 5v /, pearl chain-ization of support cannot take place easily, therefore promoting [ of an agglutination reaction ] will become inadequate. If field strength is larger than mm in 50v /, electrolysis of reaction mixture will tend to take place and measurement of an agglutination reaction will become difficult. More preferably, alternating voltage is impressed so that 10-30v /of field strength of 10-20v/mm may be obtained most preferably mm.

[0018] although the frequency of an alternating current of this invention does not influence the rate of a biological specific agglutination reaction greatly within examined limits -- desirable -- the frequency of 10kHz - 10MHz -- it is 50kHz - 1MHz in frequency more preferably.

[0019] As a support particle of this invention, a latex particle, a bentonite, a kaolin, gold colloid, an erythroid cell, gelatin, liposome, etc. are mentioned. What is generally used in the agglutination reaction as a latex particle can be used. It may be a polystyrene system latex, a polyvinyl toluene system latex, a polymethacrylate system latex, etc., and the thing of the type with which the functional-group monomer (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub> grade) was introduced by copolymerizing may be used. Desirable support is a latex particle.

[0020] Since a pearl chain is easy to be formed so that the concentration of the support particle in the system of reaction is high, an agglutination reaction is promoted. Moreover, when the biological specific active substance does not exist so that the concentration of a support particle is high, there is an inclination for whenever [ condensation / of the support particle when re-distributing ] to become large. In the

case of a latex particle, the concentration of the support particle in the system of reaction is 0.05 - 0.1 % of the weight 0.025 to 0.5% of the weight 0.01 to 1% of the weight preferably.

[0021] In the case of a latex particle, the mean particle diameter of a support particle has desirable 0.5-10 micrometers. It is not [ that a pearl chain is it hard to be formed that a mean diameter is 0.5 or less micrometers or 10 micrometers or more ] desirable. In the case of a latex particle, 1-5 micrometers of mean particle diameter of a support particle are 2-3 micrometers most preferably still more preferably.

[0022] It is indispensable that a salt exists by the comparatively high concentration of 10 or more mM in the system of reaction in this invention. In the salt concentration of 10 or less mM, promotion of a biological specific agglutination reaction is not enough, and cannot attain the purpose of this invention. Since electrolysis of reaction mixture will become easy to take place if a salt exists by the concentration of 600 or more mM in the system of reaction, it is not desirable. The concentration of 10-300mM and the most desirable salt of the concentration of a more desirable salt is 25-150mM. When the biological material etc. contains the salt as used in the field of this invention, a reagent is prepared so that it may go into the range of the above [ the salt concentration in the system of reaction ].

[0023] Since electrolysis takes place in the case where a direct-current pulse is used also in the reaction mixture of the salt concentration of about 6 mM(s), under existence of a salt, measurement of a biological specific agglutination reaction is difficult.

[0024] Although the salt in this invention promotes a biological specific agglutination reaction, it may be chosen from inside. For example, although a sodium chloride, potassium chloride, a sodium nitrate, a potassium nitrate, and an ammonium chloride are mentioned, it is not limited to this. Desirable salts are a sodium chloride, potassium chloride, an ammonium chloride, etc., and mol electrical conductivity is 10mM(s) and the salt which shows the value of 100cm<sup>2</sup> / (ohm-mol) more than in the water solution it is [ water solution ] 25 degrees C.

[0025] As a desirable mode of this invention, this approach the biological specific active substance is an antigen and/or an antibody is mentioned. As an antigen/an antibody, the aforementioned thing is mentioned and a myoglobin / anti-myoglobin antibody, Homo sapiens AFP / Homo sapiens AFP antibody, etc. are mentioned preferably.

[0026] As a desirable mode of the further this invention, a support particle is a latex particle to which sensitization of the antibody was carried out, and this approach the biological specific active substance is an antigen is mentioned. Sensitization of the antibody to a latex particle can be carried out by adsorbing or combining an antibody with a latex particle by the well-known approach conventionally. The thing of the above mentioned combination can be illustrated as an antigen and an antibody.

[0027]

[Example] Hereafter, although this invention is explained to a detail with an example and the example of a comparison, these do not limit this invention.

[0028] the anti-myoglobin antibody (product made from Organon Teknika N.V.) of 0.375mg of preparation of example 1 impression time amount and a re-distribution time

amount (1) anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent -- the 8ml glycine buffer solution (O. -- 1M glycine and 50mM sodium chloride --) After having dissolved in omitting 0.05% sodium-azide content and Following GBS, adding 2.16-micrometer fluorescent-labeling latex (Polyscience, 2.5% suspension of solid content) 2ml and agitating at a room temperature for 2 hours, centrifugal separation of the latex which carried out sensitization was carried out, and supernatant liquid was removed. 25ml (0.2%BSA-GBS) of glycine buffer-solution solutions of cow serum albumin was made to suspend precipitate 0.2%, and the anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent was prepared.

[0029] (2) The biological specific agglutination reaction was measured using the equipment of measuring device drawing 1 . Alternating voltage is impressed to the electrodes 3 and 4 (thickness of an electrode:mm [ 0.02 ], inter-electrode distance:0.5mm) inserted into slide glasses 1 and 2 by the AC-power-supply feeder. The state of aggregation of support is measured with the image processing system which consists of a fluorescence microscope 7, CCD camera 8, the image-processing board 9, and a personal computer 10.

[0030] (3) Using the glycine buffer-solution solution (0.5%BSA-GBS) of 0.5% cow serum albumin of measuring methods, the standard myoglobin was diluted and concentration 0 and a 100 ng(s)/ml specimen were prepared. These specimen 10microl and 10micro of anti-myoglobin antibody sensitization latex reagents 1 mentioned above are mixed on a slide glass, alternating voltage (square wave) with a frequency of 100kHz was impressed for 1 minute with the field strength of 20v/mm, and the pearl chain was made to form using the equipment mentioned above. The concentration of the latex particle in the system of reaction was 0.1 % of the weight. After re-distributing the latex particle which is not participating in a biological specific agglutination reaction by turning off the power immediately and leaving it for 1 - 2-minutes after the impression-during this minute, (AR) was calculated by the following formulas whenever [ condensation / of a latex particle ] using the image processing system. And the average of five screens was taken, it considered as whenever [ condensation ], and reactivity was measured.

[0031]  $AR = (\text{particle number condensed to two or more pieces}) / (\text{total particle number}) \times 100 (\%)$

(4) A change of whenever [ condensation ] with time was shown in result drawing 2 . Even if (AR) is shown whenever [ condensation / about 90% of ], it turns off the power and it made it re-distribute for 1- 2 minutes when the specimen whose myoglobin concentration is 100 ng(s)/ml impresses alternating voltage for 1 minute, whenever [ condensation ] was almost fixed at about 80%. On the other hand, although the specimen whose myoglobin concentration is 0 ng/ml showed (AR) by impressing alternating voltage for 1 minute whenever [ condensation / about 90% of ], the power was turned off and whenever [ condensation ] became about 20% by making it re-distribute for 1- 2 minutes. Although the latex particle which is not participating in a biological specific agglutination reaction by this fully condensing support by impression of the alternating voltage for 1 minute, and turning off the power immediately after impression, and leaving it for 1 - 2 minutes is re-distributed nearly completely, hardly

re-distributing the latex particle which is participating in the biological specific agglutination reaction is shown.

[0032] Example 2 The anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent was prepared like the preparation example 1 of the effect (1) anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent of applied voltage.

[0033] (2) The biological specific agglutination reaction was measured using the equipment of measuring device drawing 1.

[0034] (3) It impressed for 1 minute and the pearl-chain was made to form so that it may become the field strength which showed the alternating voltage (square wave) of 100kHz of measuring methods in Table 1. (AR) was measured whenever [ condensation / of a latex particle ] like the example 1 by turning off the power immediately and leaving it for 1 minute after the impression during this minute.

[0035] (4) The result of a result table 1 shows that 10-30v [ / ] 5-50v /is [ mm / mm ] 10-20v/mm most preferably as field strength.

[0036]

[Table 1]

交流電界強度 (100 KHz)	凝 集 度    AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
5 V/mm	12. 6	24. 8
10 V/mm	16. 0	62. 4
20 V/mm	20. 8	80. 8
30 V/mm	34. 6	84. 8
70 V/mm	(反応溶液が電気分解されたため測定できず)	

[0037] In addition, when a direct-current pulse (the frequency of 8kHz, pulse width sec of 20micro, field strength of 20v/mm) is impressed, whenever [ lifting condensation ] cannot be immediately measured by reaction mixture in electrolysis.

[0038] Example 3 Alternating voltage (square wave) with an effect frequency [ of an alternating current frequency ] of 10kHz - 10MHz was impressed so that field strength might be set to mm in 20v /, and whenever [ condensation ] was measured like the example 2. The result shown in Table 2 shows not having effect to a biological specific agglutination reaction among 10kHz - 10MHz with a big alternating current frequency.

[0039]

[Table 2]

交流周波数 (方形波)	凝 集 度    AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
10 KHz	33. 7	74. 4
100 KHz	20. 6	80. 8
1 MHz	24. 9	76. 2
10 MHz	30. 0	70. 7



[0040] Example 4 The anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent was prepared like the example 1 so that the concentration of the effect latex particle of the concentration of a latex particle might become 0.025 - 0.5% of the weight to the system of reaction. Alternating voltage (the frequency of 100kHz, the field strength of 20v/mm, square wave) was impressed, and whenever [ condensation ] was measured like the example 2. A result is shown in Table 3.

[0041]

[Table 3]

ラテックス濃度 (重量%)	凝集度 AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
0.025	9.8	45.0
0.050	15.9	64.0
0.075	18.3	77.6
0.100	20.8	80.8
0.500	40.0	80.0

[0042] Example 5 Using the latex particle of the mean particle diameter indicated to the table 4 of the effect following of the particle size of a latex particle, the anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent was prepared like the example 1 so that the concentration of a latex particle might turn into concentration given in Table 4 to the system of reaction. Impressed alternating voltage (the frequency of 100kHz, the field strength of 20v/mm, square wave), the pearl chain of a latex particle was made to form like an example 1, and the existence of formation of a pearl chain was observed. The result shown in Table 4 shows that 0.5-10 micrometers of 1-5 micrometers of mean particle diameter of a latex particle are 2-3 micrometers more preferably. The same result was obtained also in the alternating voltage (the frequency of 100kHz, field strength of 20v/mm) of a sine wave and a triangular wave.

[0043]

[Table 4]

ラテックス粒子の平均粒径	ラテックス濃度	電界の印加時間	パールチェーンの形成
10 $\mu$ m	1%	5秒以内	5~15個のパールチェーンを形成
5 $\mu$ m	1%	5秒以内	10~40個の巨大なパールチェーンを形成
3 $\mu$ m	0.5%	5秒以内	10~50個以上の巨大なパールチェーンを形成
2 $\mu$ m	0.2%	20秒以内	10個程度のパールチェーンを形成
1 $\mu$ m	0.1%	1分	10個以下のパールチェーンを形成
0.45 $\mu$ m	0.1%	1分	パールチェーンを形成せず

[0044] Example 6 Effect of the concentration of a salt (the 1)

(1) After carrying out centrifugal separation of the anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent prepared like the preparation example 1 of an anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent and removing supernatant liquid, precipitate was suspended in purified water. To the obtained suspension, further, the above-mentioned actuation of suspension was repeated 5 times to centrifugal separation and purified water, demineralization processing was performed, and it considered as the suspension of 1% of latex concentration.

[0045] (2) Formation of a pearl chain and electrolysis of reaction mixture were observed using the equipment of measuring device drawing 1.

[0046] (3) The demineralization anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent prepared by (1) was mixed with the experiment approach sodium chloride water solution (600, 300, 150, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.2, and 0mM) by 9:1, respectively, and it considered as 0.1% of latex concentration. Alternating voltage (the frequency of 100kHz, square wave) was impressed so that it might become the field strength of 0-100v/mm, and formation of a pearl chain and electrolysis of reaction mixture were observed.

[0047] (4) As shown in the result table 5, formation of a pearl chain was observed [ in / in the sodium chloride concentration in the system of reaction / the field strength of about 10v/mm ] in between 0-600mM(s). Electrolysis of reaction mixture was observed with the field strength of 13v/mm, when the sodium chloride concentration in the system of reaction was 600mM(s), and when the sodium chloride concentration in the system of reaction was 300 or less mM(s), it was observed with the field strength of about 20-30v/mm.

[0048]

[Table 5]

塩化ナトリウム 濃度 (mM)	電界強度 (V/mm)	
	パールチェーンの形成	電気分解の発生
600	8~13*	13以上
300	16~18	18以上
150	15~23	23以上
50	5~23	23以上
25	8~24	24以上
3.2	8~29	29以上

\* 5個以下のパールチェーン形成

その他は5個以上のパールチェーン形成

[0049] When the example of comparison 1 direct-current pulse (the frequency of 8kHz, pulse width sec of 20micro, and 20v/(mm)) was impressed similarly, and the sodium chloride concentration in the system of reaction was 6.25 or more mM(s), formation of a lifting and a pearl chain was not observed in electrolysis.

[0050] Example 7 Effect of the concentration of a salt (the 2)

The anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent was prepared like the example 1 using GBS so that the sodium chloride of the concentration indicated to the following

table 6 might be included in the system of reaction. Alternating voltage (the frequency of 100kHz, the field strength of 20v/mm, square wave) was impressed, and whenever [ condensation ] was measured like the example 2. The result shown in Table 6 shows that 10 or more mM of concentration of a sodium chloride are 25-150mM preferably.

[0051]

[Table 6]

反応系における 塩化ナトリウム濃度 (mM)	凝集度 AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
5	15.3	30.2
10	16.4	30.5
25	18.9	72.0
50	20.8	80.6
150	28.2	86.9

[0052] It prepared like the preparation example 1 of an example 8(1) anti-myoglobin sensitization latex reagent.

[0053] (2) The biological specific agglutination reaction was measured using the equipment of measuring device drawing 1.

[0054] (3) Using the glycine buffer-solution solution (0.5%BSA-GBS) of 0.5% cow serum albumin of measuring methods, the standard myoglobin was diluted and concentration 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, and 100 and a 250 ng(s)/ml specimen were prepared. it becomes the field strength of 20v/mm about alternating voltage (square wave) with a frequency of 100kHz using the equipment which was mixed on the slide glass and mentioned above these specimen 10microl and 10micro of anti-myoglobin sensitization latex reagents I mentioned above -- as -- respectively -- 0. -- 5 and 1.0 -- and it impressed for 1.5 minutes and the pearl chain was made to form After re-distributing the latex particle which is not participating in an immunoreaction by turning off the power immediately and leaving it for 1 minute after this impression, (AR) was measured whenever [ condensation ].

[0055] (4) From the result shown in result drawing 3, whenever [ almost sufficient in impression time amount 0.5 minutes condensation ] is shown, and it turns out in 1.0 - 1.5 minutes that it is balancing mostly whenever [ condensation ]. This shows that it is possible to detect or measure existence of the biological specific active substance with a precision sufficient moreover in a short time very much by this invention.

[0056] Preparation of an example 9 anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent and a measuring device were the same as that of an example 1. The standard myoglobin was diluted using the glycine buffer-solution solution (0.5%BSA-GBS) of cow serum albumin 0.5%, and concentration 0, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 and 100, and a 250 ng(s)/ml specimen were prepared. (AR) was measured for these specimens whenever [ condensation / of a latex particle ] like the example 2.

[0057] When the impression time amount and neglect time amount of alternating voltage are 1 minute, respectively, the result in the case of being 30 seconds,

respectively is shown in drawing 4.

[0058] It carried out each the incubation of each specimen of example of comparison 2 example 9, and the anti-myoglobin antibody sensitization latex reagent for 20 minutes at 37 degrees C for the reaction tube every [ 50micro / l ]. Whenever [ condensation ] was measured for 20micro of this reaction solution l like the example 1 for the slide glass. The result was shown in drawing 4.

[0059] Drawing 4 shows that this invention is very a short time compared with the conventional approach (it is 37 degrees C and the incubation time amount for 10 - 20 minutes is needed), and it can measure to high sensitivity.

[0060] The anti-Homo sapiens AFP antibody sensitization latex reagent was prepared like the example 1 using the preparation anti-Homo sapiens AFP antibody (the East Hokkaido chemistry incorporated company make) of an example 10(1) anti-Homo sapiens AFP antibody sensitization latex reagent.

[0061] (2) The agglutination reaction was measured using the equipment of measuring device drawing 1.

[0062] (3) Using the glycine buffer-solution solution (0.5%BSA-GBS) of 0.5% cow serum albumin of measuring methods, Criterion AFP was diluted and concentration 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 and 50,100,500, and a 1000 ng(s)/ml specimen were prepared. These specimen 10microl and 10micro of anti-Homo sapiens AFP antibody sensitization latex reagents l mentioned above are mixed on a slide glass, alternating voltage (square wave) with a frequency of 100kHz was impressed for 40 seconds with the field strength of 16v/mm, and the pearl chain was made to form using the equipment mentioned above. The concentration of the latex particle in the system of reaction was 0.1 % of the weight. After re-distributing the latex particle which is not participating in a biological specific agglutination reaction by turning off the power immediately and leaving it for 40 seconds after the impression for 40 seconds, (AR) was measured whenever [ condensation ].

[0063] (4) The result result was shown in drawing 5.

[0064] It carried out each the incubation of each specimen of example of comparison 3 example 10, and the anti-Homo sapiens AFP antibody sensitization latex reagent for 20 minutes at 37 degrees C for the reaction tube every [ 50micro / l ]. Whenever [ condensation ] was measured for 20micro of this reaction solution l like the example 1 of a comparison for the slide glass. The result was shown in drawing 5.

[0065] Drawing 5 shows that this invention is very a short time compared with the conventional approach (it is 37 degrees C and the incubation time amount for 10 - 20 minutes is needed), and it can measure to high sensitivity.

[0066]

[Effect of the Invention] According to this invention, moreover, existence of the biological specific active substance can be detected or measured by high sensitivity simpler than the conventional measuring method and quickly.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

### [Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The schematic diagram of the equipment for detecting or measuring existence of the biological specific active substance used by this invention is shown. (A) is general drawing and (B) is the sectional view of the combination section of a slide glass and an electrode.

[Drawing 2] It is a graph showing change of whenever [ condensation / at the time of stopping whenever / condensation / at the time of impression of alternating voltage /, and, impression of alternating voltage, and making it re-distribute ].

[Drawing 3] It is a graph showing the impression time amount of myoglobin concentration and alternating voltage, and the relation of whenever [ condensation ].

[Drawing 4] It is a graph showing the relation between myoglobin concentration and whenever [ condensation ].

[Drawing 5] It is a graph showing the relation between Homo sapiens AFP concentration and whenever [ condensation ].

### [Description of Notations]

1 2: Slide glass

3 4: Electrode

5: AC-power-supply feeder

6: Oscilloscope

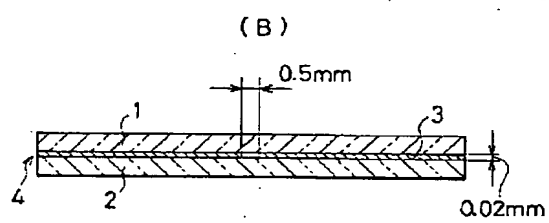
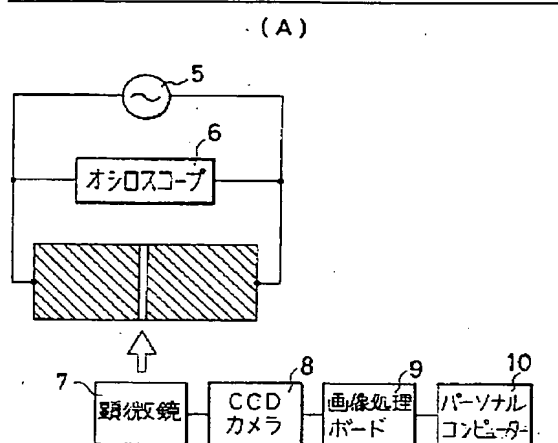
7: Fluorescence microscope

8: CCD camera

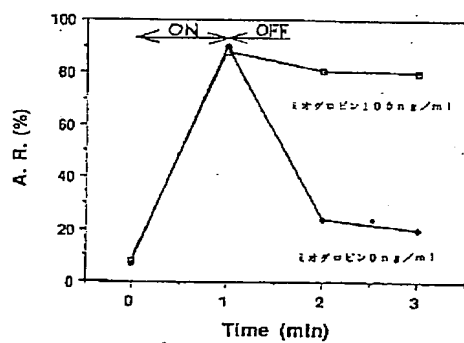
9: Image-processing board

10: Personal computer

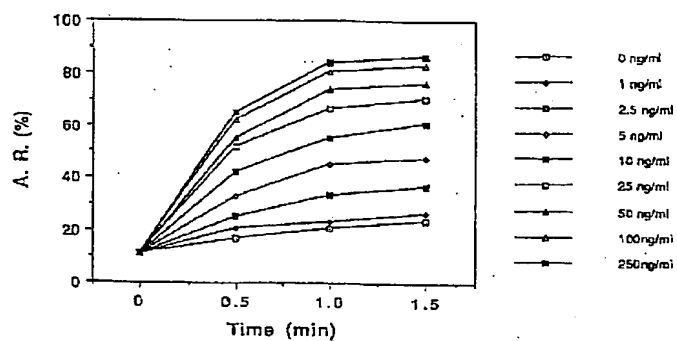
drawing 1



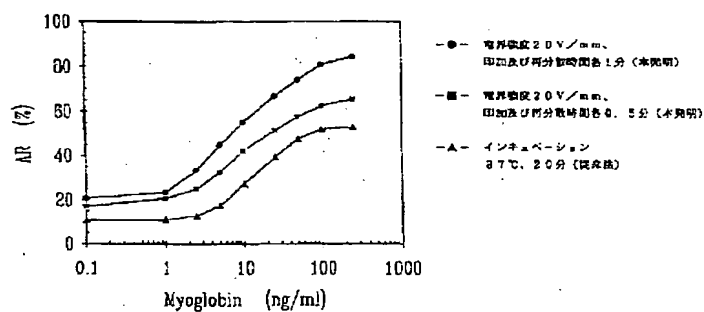
drawing 2



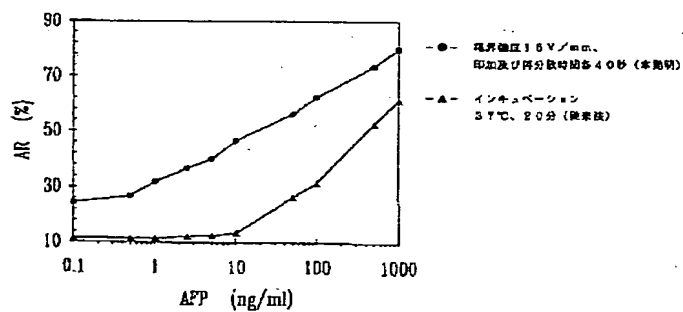
drawing 3



drawing 4



drawing 5



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-83928

(43) 公開日 平成7年(1995)3月31日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

5 8 1 B 9217-2 J

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-227097

(22) 出願日 平成5年(1993)9月13日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年3月15日  
社団法人日本化学会発行の「日本化学会第65春季年会  
1993年講演予稿集 I」に発表

(71) 出願人 591086706

輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地  
16

(72) 発明者 岩田 恵助

埼玉県久喜市青毛1192-2

(72) 発明者 民谷 栄一

石川県能美郡辰口町大口ノ1-1 職員宿  
舎A棟1階15号室

(72) 発明者 輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地  
16

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法

(57) 【要約】

【構成】 担体粒子上での生物学的特異的凝集反応により生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法において、10 mM以上の塩の共存下に5~50 V/mmの電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加する。

【効果】 従来の測定方法よりも更に簡便且つ迅速に、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することができる。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体粒子上での生物学的的特異的凝集反応により生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法であって、10mM以上の塩の共存下に5～50V/mmの電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加することを特徴とする前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は担体粒子上での生物学的的特異的凝集反応により、生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法に関する。更に詳しくは、塩の共存下に交流電圧を該反応系に印加することにより、従来よりも迅速且つ簡便に、しかも高感度で生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法としては、例えば、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法が従来より用いられている。これらの方法は高感度であり精度も高い。しかし酵素、放射線を使用するため試薬が不安定であることや保管・保存上の規制があることから、測定において細かい配慮や技術を要求されるので、より簡便な方法が求められていた。またこれらの方法は測定に比較的長時間を要するため、緊急検査においては対処が困難とされ、高感度且つ迅速な方法がさかんに研究されるようになった。

【0003】1970年以降、ラテックス、血球等の担体上での特異的凝集反応を測定する各種の光学的分析方法が開発されている。これらの分析システムにおける反応温度は、一般的には37～45℃の範囲で行われ、攪拌翼などによって攪拌することにより特異的凝集反応が進行する。このとき測定（反応）に要する時間は、およそ10～20分であり、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法に比べ迅速であるが、測定感度、測定範囲が前記測定法に比べ劣るといわれている。

【0004】免疫学的凝集反応を促進し、また形成する凝集塊を検出しやすくするために、反応系に直流パルス電圧を印加することが知られている。例えば、特開昭59-173761（鈴木ら）及び松岡らによるAnal. Chem., 57巻, 1998～2002頁（1985）には、カンディダ・アルビカンスの蒸留水懸濁液と抗体の蒸留水溶液を、電極を備えたキューベットに注入混合後、パルス高さ100V（電界強度100V/mm）の直流パルス電圧を印加して凝集反応を促進することにより約5分の反応時間で凝集率が約50%になると記載されている。

【0005】また民谷らによるBiosensors, 3(3), 139～146頁（1988）には、ラテックス粒子に結合したヒト免疫グロブリンGに対する抗体の蒸留水中懸濁液とヒト免疫グロブリンGの蒸留水溶液

2

を電極を備えたキューベットにて混合後、パルス高さ200V（電界強度200V/mm）の直流パルス電圧を印加して、10分後に50%の凝集率が得られたと記載されている。

【0006】

【解決すべき課題】しかしながら、前記の直流パルス電圧を印加する方法ではまだ凝集反応の促進が不十分なため、測定時間、測定感度、測定精度に関して十分に満足のものとはなっていない。また、前記の直流パルスを印加する方法では反応液の電気分解が起こりやすいという欠点があり、電気分解を起こさないようにするため、反応液の塩濃度を極力低くする必要があった。したがって、測定試料、特に生体試料においては反応系中の塩濃度を調製するための前処理が必要となるなど簡便な方法とはいえなかった。

【0007】したがって本発明の目的は、上記したような問題点を改善し従来の測定方法よりも更に簡便且つ迅速で、しかも高感度で生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、担体粒子上での生物学的的特異的凝集反応により生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する際に、該反応系に交流電圧を印加することにより、直流パルス電圧を印加した場合よりも、反応液の電気分解を著しく抑制でき、そのため該反応系に生物学的的特異的凝集反応を促進する作用のある塩を存在させることができることを見出した。本発明はかかる知見に基づき達成されたものである。

【0009】すなわち、本発明は、担体粒子上での生物学的的特異的凝集反応により生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法であって、10mM以上の塩の共存下に5～50V/mmの電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加することを特徴とするものである。

【0010】担体粒子は、電場をかけると直線的に並ぶこと（この現象をパールチェーン化と呼ぶ）、その後電場を停止すると直線的に並んでいた担体粒子は再分散することが知られている。パールチェーン化の際に生物学的的特異的反応性物質が存在すると、電場を停止後も担体の再分散が起こらず、パールチェーン化した担体の存在がなおも認められる。したがって、電場を停止後も再分散しない、すなわち生物学的的特異的凝集反応に関与している凝集粒子を測定することにより生物学的的特異的反応性物質の存在を検出又は測定できるのである。

【0011】本発明の目的を達成するには、（1）電場をかけたときの担体のパールチェーン化の促進、（2）電場を停止後、生物学的的特異的凝集反応に関与していない担体の再分散の促進、（3）電場を停止後、生物学的的特異的凝集反応に関与しパールチェーン化している担体

の再分散の防止・抑制、(4)電場をかけたとき塩が存在している反応液の電気分解の抑制、が重要となる。本発明は上記(1)～(4)の条件をすべて満たすことにより従来の測定方法よりも簡便且つ迅速に、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することができるのである。

【0012】本発明において「生物学的特異的凝集反応」なる用語は、ある物質が特定の物質又はごく少数の特定の物質群とのみ反応し、担体粒子上で凝集するような反応を示すものとし、幅広い反応を含み得る。例えば、抗原またはハプテンと抗体との反応(免疫反応)、相補的な核酸間のハイブリダイゼーション、レクチンとそのレセプターとの反応などを挙げることができる。

【0013】本発明における「生物学的特異的反応性物質」は、上記の生物学的特異的凝集反応をし、ラテックス、血球等を担体として使用する凝集法で測定され得る物質から選択できる。例えば、AFP、CEA、CA19-9、hCG、フェリチン等の腫瘍マーカー、プロテインC、プロテインS、AT III、FDP、D-ダイマー等の凝固線溶系マーカー、CRP、ASO、HBs抗原、HBs抗体等の感染症マーカー、TSH、プロラクチン、インシュリン等のホルモン、IgG、IgE、IgA、C3、C4等の免疫グロブリン及び補体成分、ミオグロビン、ミオシン等の組織成分、DNA等の核酸が挙げられる。

【0014】本発明において印加する電圧は、交流電圧であることが必須である。交流電圧とすることにより、直流パルス電圧の場合よりも反応液の電気分解が起こりにくく、したがって反応液中に塩の存在を許容できることとなる。後述するように、塩が存在することにより生物学的特異的凝集反応は促進される。また塩の存在が許容されるため、生体試料等を前処理することなく測定できる。

【0015】本発明において、交流電圧は波高値の電圧を示すものとする。

【0016】本発明の交流電圧の波形は連続波、パルス波のいずれであっても良く、また任意の形状とし得る。が、好ましくは方形波、矩形波、正弦波、三角波等である。最も好ましくは方形波である。

【0017】本発明の交流電圧は電界強度が5～50V/mmとなるように印加することが必須である。電界強度が5V/mmよりも小さいと担体のパールチェーン化が起こりにくく、したがって凝集反応の促進が不十分となる。電界強度が50V/mmより大きいと反応液の電気分解が起こりやすく、凝集反応の測定が困難となる。交流電圧は、より好ましくは10～30V/mm、最も好ましくは10～20V/mmの電界強度が得られるように印加する。

【0018】本発明の交流の周波数は、検討した範囲内では生物学的特異的凝集反応の速度に大きく影響しない

が、好ましくは10KHz～10MHzの周波数、より好ましくは50KHz～1MHzの周波数である。

【0019】本発明の担体粒子としては、ラテックス粒子、ベントナイト、カオリン、金コロイド、赤血球細胞、ゼラチン、リボソーム等が挙げられる。ラテックス粒子としては、凝集反応において一般に用いられているものが使用できる。ポリスチレン系ラテックス、ポリビニルトルエン系ラテックス、ポリメタクリレート系ラテックスなどであり、官能基モノマー(—COOH、—OH、—NH<sub>2</sub>、—SO<sub>3</sub>等)が共重合して導入されたタイプのものでもよい。好ましい担体はラテックス粒子である。

【0020】反応系中の担体粒子の濃度が高いほどパールチェーンが形成されやすいので凝集反応が促進される。また、担体粒子の濃度が高いほど生物学的特異的反応性物質が存在しない場合に再分散したときの担体粒子の凝集度が大きくなる傾向がある。反応系中の担体粒子の濃度は、例えばラテックス粒子の場合、好ましくは0.01～1重量%、より好ましくは0.025～0.5重量%、最も好ましくは0.05～0.1重量%である。

【0021】担体粒子の平均粒径は、例えばラテックス粒子の場合、0.5～10μmが好ましい。平均粒径が0.5μm以下又は10μm以上であるとパールチェーンが形成されにくく好ましくない。担体粒子の平均粒径は、例えばラテックス粒子の場合、さらに好ましくは1～5μm、最も好ましくは2～3μmである。

【0022】本発明では、塩が反応系中に10mM以上の比較的高い濃度で存在することが必須である。10mM以下の塩濃度では生物学的特異的凝集反応の促進が十分でなく、また本発明の目的を達成できない。塩が反応系中に600mM以上の濃度で存在すると反応液の電気分解が起こり易くなるので好ましくない。より好ましい塩の濃度は10～300mM、最も好ましい塩の濃度は25～150mMである。生体試料等が本発明でいう塩を含有している場合には、反応系での塩濃度が上記の範囲に入るように試薬の調製を行なう。

【0023】直流パルスを用いる場合では約6mMの塩濃度の反応液でも電気分解が起こるため、塩の存在下では生物学的特異的凝集反応の測定は困難である。

【0024】本発明における塩は生物学的特異的凝集反応を促進するものの中から選択され得る。例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、塩化アンモニウムが挙げられるがこれに限定されるものではない。好ましい塩は例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム等であり、モル電気伝導度が10mM、25℃の水溶液において100cm<sup>2</sup>/(Ω・mol)以上の値を示す塩である。

【0025】本発明の好ましい態様としては、生物学的特異的反応性物質が抗原及び/又は抗体である該方法が

挙げられる。抗原／抗体としては、前記のものが挙げられ、好ましくはミオグロビン／抗ミオグロビン抗体、ヒトAFP／ヒトAFP抗体等が挙げられる。

【0026】更なる本発明の好ましい態様として、担体粒子が抗体を感作させたラテックス粒子であり、生物学的特異的反応性物質が抗原である該方法が挙げられる。ラテックス粒子への抗体の感作は、例えば、従来周知の方法でラテックス粒子に抗体を吸着又は結合させることにより実施することができる。抗原及び抗体としては、前記した組み合わせのものが例示できる。

【0027】

【実施例】以下、実施例及び比較例をもって本発明を詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0028】実施例1 印加時間と再分散時間

(1) 抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製

0.375mgの抗ミオグロビン抗体(Organon Teknika N. V. 製)を8mlのグリシン緩衝液(0.1Mグリシン、50mM塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウム含有、以下GBSと略す)に溶解し、2.16μmの蛍光標識ラテックス(ポリサイエンス社、固形分2.5%懸濁液)2mlを加え室温で2時間攪拌した後、感作したラテックスを遠心分離して上清を除去した。沈殿を0.2%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液(0.2%BSA-GBS)25mlに懸濁させ、抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0029】(2) 測定装置

図1の装置を使用し生物学的特異的凝集反応を測定した。スライドガラス1、2にはさまれた電極3、4(電極の厚さ:0.02mm、電極間の距離:0.5mm)に交流電源供給装置により交流電圧を印加する。蛍光顕微鏡7、CCDカメラ8、画像処理ボード9、パーソナルコンピューター10より成る画像処理装置により、担体の凝集状態を測定する。

【0030】(3) 測定方法

0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液(0.5%BSA-GBS)を用いて、標準ミオグロビンを希釈して、濃度0及び100ng/mlの検体を調製した。これらの検体10μl、前述した抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬10μlをスライドガラス上で混合させ、前述した装置を用いて、周波数100KHzの交流電圧(方形波)を20V/mmの電界強度で1分間印加しパールチェーンを形成させた。反応系におけるラ

テックス粒子の濃度は0.1重量%であった。この1分間の印加後、直ちに電源を切り1~2分間放置することにより生物学的特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた後、画像処理装置を用いて、ラテックス粒子の凝集度(AR)を、以下の式により求めた。そして、5画面の平均をとって凝集度とし、反応性を測定した。

【0031】 $AR = (2 \text{個以上に凝集した粒子数}) / (\text{総粒子数}) \times 100 (\%)$

10 (4) 結果

図2に凝集度の経時的な変化を示した。ミオグロビン濃度が100ng/mlの検体は、交流電圧を1分間印加することにより約90%の凝集度(AR)を示し、電源を切って1~2分間再分散させても凝集度は約80%でほぼ一定であった。一方、ミオグロビン濃度が0ng/mlの検体は、交流電圧を1分間印加することにより約90%の凝集度(AR)を示したが、電源を切って1~2分間再分散させることにより凝集度は約20%となった。このことは、1分間の交流電圧の印加で担体は十分に凝集し、また印加後直ちに電源を切り1~2分間放置することにより、生物学的特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子はほぼ完全に再分散するが、生物学的特異的凝集反応に関与しているラテックス粒子はほとんど再分散しないことを示している。

【0032】実施例2 印加電圧の影響

(1) 抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製

実施例1と同様にして抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0033】(2) 測定装置

図1の装置を使用し生物学的特異的凝集反応を測定した。

【0034】(3) 測定方法

100KHzの交流電圧(方形波)を表1に示した電界強度になるように1分間印加しパールチェーンを形成させた。この1分間の印加後、直ちに電源を切り1分間放置することにより実施例1と同様にしてラテックス粒子の凝集度(AR)を測定した。

【0035】(4) 結果

表1の結果から、電界強度としては5~50V/mm、より好ましくは10~30V/mm、最も好ましくは10~20V/mmであることが分かる。

【0036】

【表1】

交流電界強度 (100KHz)	凝集度 AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
5V/mm	12.6	24.8
10V/mm	16.0	62.4
20V/mm	20.8	80.8
30V/mm	34.6	84.8
70V/mm	(反応溶液が電気分解されたため測定できず)	

【0037】なお、直流パルス（周波数8KHz、パルス幅20 $\mu$ sec、電界強度20V/mm）を印加した場合、直ちに反応液が電気分解を起こし凝集度は測定不能であった。

#### 【0038】実施例3 交流周波数の影響

周波数10KHz～10MHzの交流電圧（方形波）を電界強度が20V/mmとなるように印加し、実施例2と同様にして凝集度を測定した。表2に示した結果から、交流周波数は10KHz～10MHzの間では生物学的特異的凝集反応に大きな影響を与えないことが分かる。

【0039】

【表2】

交流周波数 (方形波)	凝集度 AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
10KHz	33.7	74.4
100KHz	20.6	80.8
1MHz	24.9	76.2
10MHz	30.0	70.7

【0040】実施例4 ラテックス粒子の濃度の影響  
ラテックス粒子の濃度が反応系に対して0.025～0.5重量%になるように抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を実施例1と同様にして調製した。交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm、方形波）を印加して、凝集度を実施例2と同様にして測定し\*

【0041】

【表3】

ラテックス濃度 (重量%)	凝集度 AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
0.025	9.8	45.0
0.050	15.9	64.0
0.075	18.3	77.6
0.100	20.8	80.8
0.500	40.0	80.0

#### 【0042】実施例5 ラテックス粒子の粒径の影響

下記の表4に記載した平均粒径のラテックス粒子を用い、ラテックス粒子の濃度が反応系に対して表4に記載の濃度になるように抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を実施例1と同様にして調製した。交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm、方形波）を印加して、ラテックス粒子のパールチェーンを実施例1と同様にして形成させ、パールチェーンの形成の有無を観察した。表4に示した結果から、ラテックス粒子の平均粒径は0.5～10 $\mu$ m、好ましくは1～5 $\mu$ m、より好ましくは2～3 $\mu$ mであることが分かる。正弦波、三角波の交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm）においても同様な結果が得られた。

【0043】

【表4】

ラテックス粒子の平均粒径	ラテックス濃度	電界の印加時間	パールチェーンの形成
10 $\mu$ m	1%	5秒以内	5～15個のパールチェーンを形成
5 $\mu$ m	1%	5秒以内	10～40個の巨大なパールチェーンを形成
3 $\mu$ m	0.5%	5秒以内	10～50個以上の巨大なパールチェーンを形成
2 $\mu$ m	0.2%	20秒以内	10個程度のパールチェーンを形成
1 $\mu$ m	0.1%	1分	10個以下のパールチェーンを形成
0.45 $\mu$ m	0.1%	1分	パールチェーンを形成せず

#### 【0044】実施例6 塩の濃度の影響（その1）

(1) 抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製

実施例1と同様にして調製した抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を遠心分離して上清を除去した後、沈殿

を精製水に懸濁した。得られた懸濁液に対し、更に遠心分離、精製水に懸濁という上記の操作を5回繰り返して脱塩処理を行い、ラテックス濃度1%の懸濁液とした。

#### 【0045】(2) 測定装置

図1の装置を使用しパールチェーンの形成、反応液の電気分解を観察した。

#### 【0046】(3) 実験方法

塩化ナトリウム水溶液(600、300、150、75、50、25、12.5、6.25、3.2及び0 mM)と(1)で調製した脱塩抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬をそれぞれ9:1で混合しラテックス濃度0.1%とした。交流電圧(周波数100 KHz、方形波)を0~100 V/mmの電界強度になるように印加\*

塩化ナトリウム濃度 (mM)	電界強度 (V/mm)	
	パールチェーンの形成	電気分解の発生
600	8~13*	13以上
300	16~18	18以上
150	15~23	23以上
50	5~23	23以上
25	8~24	24以上
3.2	8~29	29以上

\* 5個以下のパールチェーン形成

その他は5個以上のパールチェーン形成

#### 【0049】比較例1

直流パルス(周波数8 KHz、パルス幅20  $\mu$ sec、20 V/mm)を同様に印加したところ、反応系中の塩化ナトリウム濃度が6.25 mM以上の場合には電気分解を起こし、パールチェーンの形成が観察されなかった。

#### 【0050】実施例7 塩の濃度の影響(その2)

下記の表6に記載した濃度の塩化ナトリウムを反応系に含むようにGBSを用い抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を実施例1と同様にして調製した。交流電圧(周波数100 KHz、電界強度20 V/mm、方形波)を印加して、凝集度を実施例2と同様にして測定した。表6に示した結果から、塩化ナトリウムの濃度は10 mM以上、好ましくは25~150 mMであることが分かる。

#### 【0051】

#### 【表6】

\*し、パールチェーンの形成、反応液の電気分解を観察した。

#### 【0047】(4) 結果

表5に示したように、反応系中の塩化ナトリウム濃度が0~600 mMの間において約10 V/mmの電界強度においてパールチェーンの形成が観察された。反応液の電気分解は、反応系中の塩化ナトリウム濃度が600 mMの場合には13 V/mmの電界強度で観察され、反応系中の塩化ナトリウム濃度が300 mM以下の場合には約20~30 V/mmの電界強度で観察された。

#### 【0048】

#### 【表5】

反応系における塩化ナトリウム濃度 (mM)	凝集度 AR (%)	
	ミオグロビン濃度	
	0 $\mu$ g	100 $\mu$ g
5	15.3	30.2
10	16.4	30.5
25	18.9	72.0
50	20.8	80.6
150	28.2	86.9

#### 【0052】実施例8

(1) 抗ミオグロビン感作ラテックス試薬の調製  
実施例1と同様にして調製した。

#### 【0053】(2) 測定装置

図1の装置を使用し生物学的特異的凝集反応を測定した。

#### 【0054】(3) 測定方法

0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液(0.5%BSA-GBS)を用いて、標準ミオグロビンを希釈し、濃度0、1.0、2.5、5.0、10、25、50、100、及び250 ng/mlの検体を調製した。これらの検体10  $\mu$ l、前述した抗ミオグロビン感作ラテックス試薬10  $\mu$ lをスライドガラス上で混合させ、前述した装置を用いて、周波数100 KHzの交流電圧(方形波)を20 V/mmの電界強度になるようにそれぞれ0.5、1.0及び1.5分間印加しパールチ

ェインを形成させた。この印加後、直ちに電源を切り1分間放置することにより免疫反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた後、凝集度（AR）を測定した。

#### 【0055】（4）結果

図3に示した結果から、印加時間0.5分でほぼ十分な凝集度を示し、1.0～1.5分で凝集度はほぼ平衡になることが分かる。このことは、本発明により非常に短時間でしかも精度良く生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することが可能であることを示している。

#### 【0056】実施例9

抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製、測定装置は実施例1と同様であった。0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液（0.5%BSA-GBS）を用いて、標準ミオグロビンを希釈して、濃度0.0、1、1、2、5、5、10、25、50、100、及び250ng/mlの検体を調製した。これらの検体を実施例2と同様にして、ラテックス粒子の凝集度（AR）を測定した。

【0057】交流電圧の印加時間及び放置時間がそれぞれ1分の場合及びそれぞれ30秒の場合の結果を図4に示す。

#### 【0058】比較例2

実施例9の各検体と抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を各50μlずつ反応チューブにとり、37℃で20分間インキュベーションした。この反応溶液20μlをスライドグラスにとり、実施例1と同様にして凝集度を測定した。結果を図4に示した。

【0059】図4から、本発明は従来（37℃で、10～20分のインキュベーション時間が必要とされている）に比べ非常に短時間で、かつ高感度に測定することができることが分かる。

#### 【0060】実施例10

（1）抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬の調製  
抗ヒトAFP抗体（道東化学株式会社製）を用いて、実施例1と同様にして抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬を調製した。

#### 【0061】（2）測定装置

図1の装置を使用し凝集反応を測定した。

#### 【0062】（3）測定方法

0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液（0.5%BSA-GBS）を用いて、標準AFPを希釈し、濃度0.0、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10、50、100、500及び1000ng/mlの検体を調製した。これらの検体10μl、前述した抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬10μlをスライドグラ

ス上で混合させ、前述した装置を用いて、周波数100KHzの交流電圧（方形波）を16V/mmの電界強度で40秒間印加しパールチェーンを形成させた。反応系中のラテックス粒子の濃度は0.1重量%であった。40秒間の印加後、直ちに電源を切り40秒間放置することにより生物学的特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた後、凝集度（AR）を測定した。

#### 【0063】（4）結果

10 結果を図5に示した。

#### 【0064】比較例3

実施例10の各検体と抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬を各50μlずつ反応チューブにとり、37℃で20分間インキュベーションした。この反応溶液20μlをスライドグラスにとり、比較例1と同様にして凝集度を測定した。結果を図5に示した。

20 【0065】図5から、本発明は従来（37℃で、10～20分のインキュベーション時間が必要とされている）に比べ非常に短時間で、かつ高感度に測定することができることが分かる。

#### 【0066】

【発明の効果】本発明によれば、従来（37℃）よりも簡便かつ迅速に、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で使用した生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定するための装置の概略図を示す。

（A）は全体図、（B）はスライドグラスと電極の組合せ部の断面図である。

30 【図2】交流電圧の印加時の凝集度及び交流電圧の印加を停止し再分散させた時の凝集度の変化を表わすグラフである。

【図3】ミオグロビン濃度、交流電圧の印加時間と凝集度の関係を表わすグラフである。

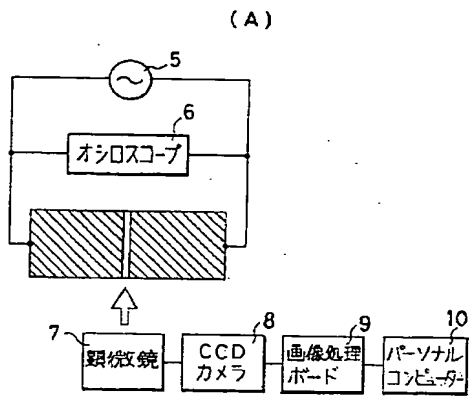
【図4】ミオグロビン濃度と凝集度の関係を表わすグラフである。

【図5】ヒトAFP濃度と凝集度の関係を表わすグラフである。

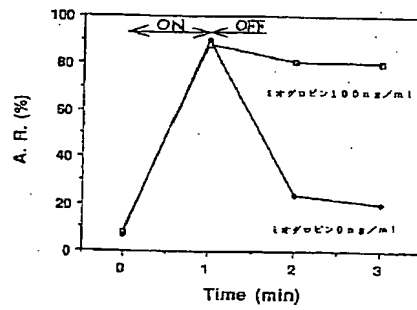
#### 【符号の説明】

- 40 1、2：スライドグラス  
3、4：電極  
5：交流電源供給装置  
6：オシロスコープ  
7：蛍光顕微鏡  
8：CCDカメラ  
9：画像処理ボード  
10：パーソナルコンピューター

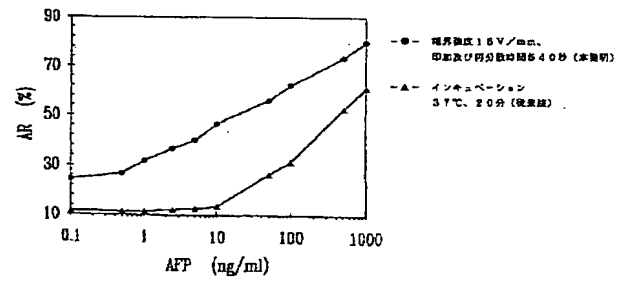
【図1】



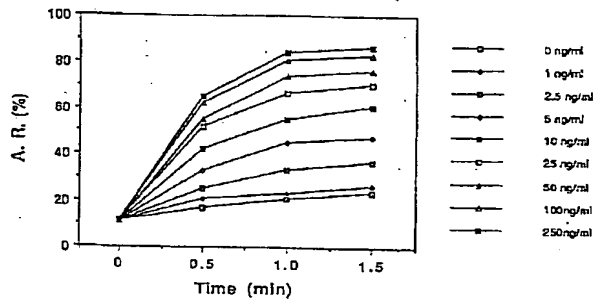
【図2】



【図5】



【図3】



【図4】

